

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-268963

(43)Date of publication of application : 19.10.1993

(51)Int.Cl. C12N 15/10
B01J 20/02

(21)Application number ~~04-113578~~ (71)Applicant : BECTON DICKINSON & CO

(22)Date of filing : 06.05.1992 (72)Inventor : WOODARD DANIEL L

(30)Priority

Priority number : 91 695113 Priority date : 03.05.1991 Priority country : US

(54) SOLID PHASE EXTRACTION PURIFICATION OF DNA

(57)Abstract:

PURPOSE: To purify DNA from any source in any form.

CONSTITUTION: This process is characterized in that a water-soluble organic solvent is used in purification of DNA. The use of water-soluble organic solvents, for example, ethanol, propanol or isopropanol enables the purification of DNA in high recovery ratios. Further, the use of water-soluble organic solvents can avoid the use of caustic and poisonous compositions such as chaotropes.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.05.1992

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2130984

[Date of registration] 18.07.1997

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right] 05.06.2005

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許出願公告番号

特公平7-51065

(24) (44) 公告日 平成7年(1995) 6月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09				
B 0 1 J 20/02		Z 7202-4G		
		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

請求項の数5 (全 8 頁)

(21) 出願番号	(特願平4-113578)	(71) 出願人	591007332 ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー BECTON DICKINSON AND COMPANY アメリカ合衆国ニュージャージー州07417-1880, フランクリン・レイクス, ワン・ベクトン・ドライブ (番地なし)
(22) 出願日	平成4年(1992) 5月6日	(72) 発明者	ダニエル・エル・ウッダード アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27606, ローリー, アヴェント・リッジ・ロード 1800 アpartment 203
(65) 公開番号	特開平5-268963	(74) 代理人	弁理士 湯浅 恭三 (外6名)
(43) 公開日	平成5年(1993)10月19日		
(31) 優先権主張番号	6695113		
(32) 優先日	1991年5月3日		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

審査官 加藤 浩

(54) 【発明の名称】 DNAの固相抽出精製

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程からなる、溶液からDNAを精製する方法：

- 前記溶液に、セライト珪そう土、シリカポリマー、珪酸マグネシウム、シリコン窒素化合物、珪酸アルミニウムおよび二酸化珪素からなる群から選択される親水性表面を添加し；
- 水溶性有機溶媒を添加し；
- (a) および(b) 工程からの成分を含むDNA溶液を液体画分と非液体画分に分離し；
- (c) 工程からの非液体画分を洗浄し；
- (d) 工程からの非液体画分から液体画分を分離し；そして
- (e) 工程からの非液体画分からDNAを遊離させる。

【請求項2】 水溶性有機溶媒が、イソプロパノール、プロパノールおよびエタノールからなる群から選択される溶媒である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 水溶性有機溶媒が、約1%ないし約99%のイソプロパノール、約1%ないし約99%のプロパノールおよび約1%ないし約99%のエタノールからなる群から選択される溶媒である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 工程(f)の後に、さらに、溶出バッファーを添加する工程(g)を含む、請求項1記載の方法。

【請求項5】 親水性表面がセライト珪そう土である、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は分子生物学の分野に関する。特に、本発明はデオキシリボ核酸の精製の分野に関

(2)

3

する。

【0002】

【従来の技術】分子生物学および関連する学問分野の絶え間ない進歩は、前進した技術を十分に理解しおよび発展させるために、改良された手段を継続的に必要とする。

【0003】様々な技術に、デオキシリボ核酸(DNA)を種々の形態で使うことが含まれる。例えば、組換えDNA技術の領域の進歩は、常にDNAをプローブ、ゲノムDNA、およびプラスミドDNAの形状で用いることを要求する。

【0004】診断分野の進歩もまた、DNAを種々の方法で使い続けている。例えば、DNAプローブは、ヒトの病原因子の検出および診断に日常的に用いられている。同様にDNAは遺伝疾患の検出に用いられている。DNAはまた食品汚染の検出にも用いられている。さらに、DNAは遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味あるDNAの位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0005】多くの場合、DNAは極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を浪費する煩雑な操作はDNAの損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料のDNAの精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0006】典型的なDNA精製手法には、腐食性で有毒な組成物の使用が含まれる。典型的なDNA精製手法は、高濃度のカオトロピック塩(例えばヨウ化ナトリウムおよび過塩素酸ナトリウム)を使用する。

【0007】DNAの精製には多くの手法が存在する。DNA精製分野での最近の活動が示しているように、最適なDNA精製手法を求めて絶え間無い探究が行われている。米国特許第4,923,978号に開示されているDNAの精製法では、蛋白質とDNAの溶液を水酸基を持たせた支持体に通過させて蛋白質を結合させ、そしてDNAを溶出している。米国特許第4,935,342号で開示されているDNAの精製法では、DNAを選択的に陰イオン交換体に結合させ、つづいて溶出している。米国特許第4,946,952号は、水溶性のケトンで沈澱させることよりなるDNAの単離法を開示している。カオトロピック剤を用いたDNAの精製手法および透析されたDNAが、米国特許第4,900,677号に開示されている。

【0008】現在知られているDNA精製手法はその目的を達成することが可能であるとは言え、そのような腐食性で有毒な化合物(例えば最もしばしば用いられるカオトロピック剤)の使用なしにDNAを精製し、かつ増大量のDNAを取得できることが望ましい。

4

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は非腐食性で非毒性の溶媒を用いることよりなるDNAの精製法を提供する。

【0010】本発明の一態様においては、水溶性有機溶媒を添加してDNAを親水性表面に結合させることよりなる、溶液からDNAを精製する方法が提供される。

【0011】好ましい態様においては、次の工程からなる溶液からのDNAの精製方法が提供される：

- (a) 親水性表面を溶液に添加する；
- (b) 水溶性有機溶媒を添加する；
- (c) 工程(a)および(b)からのDNA溶液を液体画分と非液体画分に分離する；
- (d) 工程(c)の非液体画分を洗浄する；
- (e) 工程(d)の非液体画分から液体画分を除去する；
- (f) (e)の非液体画分からDNAを遊離させる。

【0012】本発明は、より大量の精製DNAを得るために特に有用である。加えて、DNAは任意の親水性表面に結合させて精製することができる。また、精製は室温で好適に行うことができる。

【0013】本発明は任意のDNA精製手法で提唱されている結合バッファの代わりに水溶性有機溶媒を用いて行うことができる。本明細書中で用いられる「精製」とは実質的に細胞屑その他を含まないDNAを取得することを意味する。

【0014】

【課題を解決するための手段】DNAの精製または単離工程の出発時には、どの場合も所望のDNAを供給源から取得することが必要である。血清、尿およびバクテリアのカルチャー等の試料からDNAを得る典型的な手法はよく知られており、日常的方法で行うことができる。同様にゲノムライブラリー等からDNAを得る技術も日常的方法が知られている。

【0015】本発明は個々の供給源から得られたDNAの精製に関する。本発明の実施に際してDNAの起源はキーポイントではない。発明のキーポイントは供給源から取得した後にDNAを精製する能力である。DNAを得るための典型的方法は、DNAを溶液中に懸濁させた段階で終わっている。生物学的サンプルからDNAを単離するための文献には次のものが含まれる：Harding, J. D., Gebeyehu, G., Bebe, R., Simms, D., Ktevan, L., Nucleic Acids Research, 17: 6947 (1989) およびMarko, M. A., Chipperfield, R., およびBirnbom, H. C., Analytical Biochemistry, 121: 382 (1982)。プラスミドDNAの単離方法は、Lutze, L. H., Winegar, R. A., Nucleic Acids Research 20: 6150 (1990)に記載され

(3)

5

ている。生物学的サンプルからの二本鎖DNAの抽出は、Yamada, O., Matsumoto, T., Nakashima, M., Hagri, S., Kamahora, T., Ueyama, H., Kishi, Y., Uemura H., Kurimura, T., Journal of Virological Methods 27:203 (1990)に記載されている。大部分のDNA溶液は、DNAを適当なバッファー（例えばTE（トリス-EDTA）、TEAバッファー（40mMトリス-酢酸, 1mM EDTA））中またはライゼート中に含んでいる。

【0016】DNAを適当な溶液中に取得した後、典型的には結合マトリックスをこの溶液に添加する。一般に用いられる結合マトリックスは、ガラスまたは珪素土の形態のシリカである。

【0017】結合マトリックスをDNAの溶液に添加した後、結合バッファーを添加する。本発明は、結合バッファーとして水溶性有機溶媒を使用する。「水溶性有機溶媒」とは、DNAを溶液の状態に保持することを可能にする有機特性を有することを意味する。

【0018】粒子、ビーズ、その他の親水性表面を用いて本発明を実施する好ましい工程は、結合工程、洗浄工程、乾燥工程および溶出工程を含んでいる。結合工程は一般に、DNAを含有する溶液への親水性表面の添加、水溶性有機溶媒からなる溶液の添加（親水性表面および水溶性有機溶媒の添加順序は重要ではない）、攪拌、遠心分離、および液体画分の除去を含んでいる。結合工程は、通常、少なくとも一回反復される。洗浄工程は、一般に、溶媒を除去するための洗浄バッファーの添加（例えば50%エタノールおよび50%（40mM トリス, 4mM EDTA, 0.8N NaCl, pH7.4））、攪拌、遠心分離、および液体の除去を含んでいる。乾燥工程は、一般に、約40-70℃で約2ないし20分間乾燥することよりなる。溶出工程は、一般に、溶出バッファーの添加（表面からDNAを遊離させるため：例えば（10mM トリス, 1mM EDTA, pH8.0））、約30秒間の渦巻攪拌、約40-70℃における約10分間の加熱、約2分間の遠心分離および液体の回収を含んでいる。この時点で液体中にDNAが含まれる。この溶出工程は通常少なくとも1回反復される。

【0019】本発明をフィルターのような親水性表面で実施するには、好ましい工程は結合工程、洗浄工程および溶出工程を含む。結合工程は一般に、DNAを含有する溶液への水溶性有機溶媒の添加、生じた溶液のフィルターへの通過（典型的には、プロッターのウェル、または他の任意の濾過システム（例えば、シリンジ濾過器）を用いる）、および所望によりこのフィルターに水溶性有機溶媒を通過させることを含んでいる。濾過の後フィルターを軽く風乾する（約1分間）。洗浄工程は、一般

6

に、フィルターへバッファーを通過させること（溶媒を除去するため）からなる。一般に、このフィルターを軽く風乾する（約1分間）。溶出工程は一般にフィルターからDNAを除去することからなる。溶液に接触したフィルターの部分を切り取って遠心管に入れる。次に、溶出バッファー（フィルターからDNAを遊離させるため）を添加して、約40-60℃で約10分間加熱する。そして、DNAを含んだ液体を取り出す。

【0020】適する水溶性有機溶液には、エタノール、プロパノール、イソプロパノールおよびアセトニトリルが含まれる。本発明の実施のためには水溶性有機溶媒を種々の濃度で用いることもできる。好ましくは、溶媒は100%イソプロパノール、エタノールまたはプロパノールである。最も好ましくは、溶媒はイソプロパノールである。水溶性有機溶媒の適する濃度は、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、およびアセトニトリルの1%ないし100%溶液を包含する。好ましくは、その濃度は20%ないし80%である。最も好ましくは、この濃度は40%ないし60%である。典型的には、溶媒の濃度を種々に低下させることは水によるが、しかしながら、複数溶媒の組み合わせを用いることもできる。溶媒の好ましい組み合わせには、イソプロパノールとエタノール、イソプロパノールとプロパノール、およびプロパノールとエタノールが含まれる。

【0021】本発明の実施に用いるために適する結合マトリックスには、任意の親水性表面が含まれる。本発明の実施の使用に適する親水性表面の例には、ニトロセルロース、セライト珪素土、シリカポリマー、グラスファイバー、珪酸マグネシウム、シリコン窒素化合物（例えばSiN₄）、珪酸アルミニウム、および二酸化珪素が含まれる。親水性表面が有することのできる多くの形状も本発明における使用に適する。親水性表面の適する形状には、ビーズ、ポリマー、粒子、およびフィルター（例えば膜）が含まれる。

【0022】結合バッファー、例えばよく知られているカオトロピック剤は、その水和性のため溶液中のDNAを親水性表面に結合させると信じられる。カオトロピック剤の水和性は、水の分子とDNAとの相互作用を低下させると信じられる。そのため、DNAと親水性表面を取り囲む水の分子との相互作用が強いられ、このことが水素結合による親水性表面へのDNAの結合を生じさせると信じられる。

【0023】理論により拘束や制限を受けることは望まないが、本発明は水溶性有機溶媒を「結合バッファー」として用いることにより、DNA溶液の水溶液としての特性を低下させると信じられる。DNA溶液の水溶液としての特性を減じることにより、DNAと親水性表面との相互作用が強いられ、これにより固相抽出が奏されたと信じられる。これに加え、後記実施例で証明するように、本発明は親水性表面への結合を介して精製が行わ

(4)

7

れ、精製は沈澱によるものではない。

【0024】本発明は、多様な供給源からおよび多様な形態のDNAの精製に用いることができる。精製のためのDNAの供給源には、バクテリア、バクテリオファージ、標本、植物、動物、およびその他が含まれる。DNAは多様な形態で見出され、そのような形態には一本鎖、二本鎖、環状、および直鎖状が含まれる。本発明は任意の供給源からの任意の形態のDNAについて実施することができる。

【0025】以下の実施例において、本明細書中に説明されている発明の特定の態様を説明する。当業者に明らかとなり、種々の変更および修飾が可能であり、それ*

8

*らは本発明の範囲内である。

【0026】

【実施例】

【0027】

【実施例1】この実験は、6M NaClO₄ (プレッパア ジーン (prep-a-gene)) に対する各結合バッファの結合特性を比較する。すべての実験は、プレッパア ジーン マトリックス (Prep-a-geneキット、バイオラッド社 (Bio-Rad)、リッチモンド、CA) 中で行い、結合バッファを変える以外は同じ条件で行う。

【0028】

物質:		LOT #
ポリエチレングリコール (PEG)	フルカ (フルカケミカルコーポレーション、ロンコン、NY)	24718584 MW
尿素	フィッシャー (フィッシャーサイエンティフィック、ノークロス、GA)	895704
KSCN	シグマ (シグマケミカルカンパニー、セントルイス、Mo.)	488-0409
(チオシアン酸カリウム)		
エタノール (EtOH)	フィッシャー	902233
ブタノール (BuOH)	フィッシャー	890783
グリセロール	シグマ	104F-0026
塩酸グアニジン	BRL	9DB209
水酸化ナトリウム (NaOH)	フィッシャー	862699
水酸化アンモニウム (NH ₄ OH)	フィッシャー	860118
硫酸 (H ₂ SO ₄)	フィッシャー	860102
アセトニトリル (CH ₃ CN)	フィッシャー	890789
酢酸ナトリウム (NaOAc)	シグマ	S-2889
プレッパア ジーン キット	バイオラッド	ロット19F-0010 コントロール
λ DNA (503 μg/803 μl)	BRL (ベセスダリサーチラプズ、グランドアイランド、NY)	41180 56125A

方法: 13すべての結合バッファを同じ条件で使用した。

【0029】各13サンプルに20 μlのプレッパア ジーン 珪そう土溶液を加えて、次に750 μlの結合バッファを軽く渦巻攪拌し、そして5分間45℃においてインキュベートし、2分間遠心分離し、上清を捨て、そして結合工程を繰り返した。500 μlの洗浄バッファで洗浄し、遠心分離し、バッファを捨て、そして繰り返した。25 μlの溶出バッファを加えて、渦巻攪拌し、5分間50℃においてインキュベートし、遠心分離し、上清を保管し、そして繰り返した。各13サンプルおよび一つのスタンダードをゲル電気泳動し

た。

40 【0030】以下の結合バッファを使用のために示す:

- 1) プレッパア ジーン キットのスタンダード6M NaClO₄ (過塩素酸ナトリウム)
- 2) 10% PEG
- 3) 20% PEG
- 4) 6M グリセロール
- 5) 95% エタノール
- 6) 100% ブタノール
- 7) 6M KSCN
- 50 8) 6M 尿素

(5)

9

- 9) 8M 塩酸グアニジン
 10) 30% NH_4OH
 11) 10% H_2SO_4
 12) 100% CH_3CN
 13) 6M NaOAc
 14) スタンダード λ DNA
 13の溶出DNAサンプルとオリジナルDNAサンプル(λ DNA)とを比較したゲル電気泳動の結果によれば、エタノールは固相上(プレップ ア ジーンマトリックス)におけるDNAの保持に関して、試験された6M過塩素酸ナトリウムおよび他のどの結合バッファーよりも優れている。アセトニトリルも良好であった。

【0031】

【実施例2】この実験は、実施例1において得られた結果を拡張するものである。この実験において、エタノールと CH_3CN が良好なDNA結合バッファーであることが示された。この実験において、どの程度の%のエタノール、 CH_3CN およびメタノールが結合バッファー中に存在することができ、そしてDNAの良好な分離および回収が得られるかが測定される。すべての実験はプレップ ア ジーンマトリックスを使用して実施される。

【0032】物質:

プレップ ア ジーン キット バイオラッド
 エタノール フィッシャー
 メタノール フィッシャー
 CH_3CN フィッシャー
 1%アガロースゲル
 λ DNA BRL 56125A, 9モル 104 503 μg (803 μl 中)

実験

15画分/実験が使用される結合バッファー中のみを変更して行われた。洗浄バッファー、溶出バッファーおよび固相はすべてプレップ ア ジーン キットのものであった。その方法は、実質的に実施例1に教示されたとおり実施される。1. 3 μl の λ DNAを各画分において使用する。

【0033】画分(100%以外は水で希釈する)

- 1) 100% エタノール(水溶液)
 2) 80% エタノール(水溶液)
 3) 60% エタノール(水溶液)
 4) 40% エタノール(水溶液)
 5) 20% エタノール(水溶液)
 6) 100% メタノール(水溶液)
 7) 80% メタノール(水溶液)
 8) 60% メタノール(水溶液)
 9) 40% メタノール(水溶液)
 10) 20% メタノール(水溶液)
 11) 100% CH_3CN (水溶液)
 12) 80% CH_3CN (水溶液)

10

- 13) 60% CH_3CN (水溶液)
 14) 40% CH_3CN (水溶液)
 15) 20% CH_3CN (水溶液)
 15の試験画分から溶出されたDNAはゲル電気泳動により分析され、そしてスタンダードDNAサンプル(48 μl のTEバッファー(10mM トリス塩酸、1mM EDTA、pH8.0)中の1.3 μl の λ DNA)と比較された。その結果、100%エタノールが最良の結合バッファーであり、2番目が100%アセトニトリルであった。結合バッファーに付与されたより有機的な特性がより良好なDNAの保持をもたらす。

【0034】

【実施例3】この実験は、結合能力に関して、プロパノール(PrOH)、イソプロパノール(iPrOH)およびエタノール(EtOH)と、それらの互いの希釈物並びに NaClO_4 とを比較している。プレップ ア ジーン マトリックスに対するDNAの結合への有機的効果を最大にすることを目的とする。

【0035】物質:

- プレップ ア ジーン キット バイオラッド コントロール(キット)41492,
 マトリックス 40523
 λ DNA (503 μg /803 μl) BRL 56125A,
 9モル 104
 1%アガロースゲル
 EtOH フィッシャー 902233
 PrOH フィッシャー 744241
 iPrOH アルドリッチ 06208T
 W
 DMSO アルドリッチ 9624HC
 (ジメチルスルフォキシド)

方法: 13画分について行われた。各13画分に使用された結合バッファーを以下に示す。すべて、結合バッファー以外はプレップ ア ジーン キット材料を用いて行われ、そして実質的には実施例1の教示によるプレップ ア ジーン方法を用いて行われた。

【0036】使用された結合バッファー:

- 1) 100% プロパノール
 2) 80% プロパノール 20% H_2O
 3) 100% イソプロパノール
 4) 80% イソプロパノール 20% H_2O
 5) 100% DMSO
 6) 80% DMSO 20% H_2O
 7) 20% プロパノール 80% エタノール
 8) 40% プロパノール 60% エタノール
 9) 60% プロパノール 40% エタノール
 10) 20% イソプロパノール 80% エタノール
 11) 40% イソプロパノール 60% エタノール

(6)

11

12) 60% イソプロパノール 40% エタノール

13) プレップ ア ジーン結合バッファー 6M NaClO₄

14) スタンダードDNA (λ DNA)

溶出されたDNAをゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダードDNAサンプルと比較した。その結果、100%イソプロパノールが最良の結合バッファーであることが示唆される。100%プロパノールも良好なDNAの保持をもたらした。イソプロパノールおよびプロパノールは水に80%に希釈することができ、DNAの保*

DNAを保持するもの

- 1) iPrOH
- 2) EtOH
- 3) 6M NaClO₄
- 4) 60% iPrOH 40% EtOH
- 5) 60% PrOH 40% EtOH
- 6) PrOH
- 7) A) 40% iPrOH 60% EtOH
B) 40% PrOH 60% EtOH
- 8) A) 80% iPrOH 20% H₂O
B) 80% PrOH 20% H₂O
- 9) A) 20% PrOH 80% EtOH
B) 20% PrOH 80% EtOH
- 10) 8M塩酸グアニジン
- 11) 6M KSCN
- 12) CH₃CN
- 13) NaI
- 14) BuOH
- 15) 6M グアニジンHSCN
- 16) 6M (NH₄)₂SO₄
- 17) 6M NaCl

【0040】

【実施例4】この実験は、さまざまなフィルター（膜）に対するDNAの固着能力に関して、結合バッファーNaO₃ClとiPrOHを比較している。

【0041】物質：ゲルマンサイエンス（Gelman Sciences, Inc.）フィルター（ゲルマンサイエンス社、アンアーバー、MI）タイプAEグラスフィルター（ロット603202）。

【0042】MSIグラスファイバーフィルター（ミクロンセパレーション（Micron Separation, Inc.）、ウエストボール、MA）（ロット19571）。

【0043】ワットマンGF/B（ワットマン社（Wh）※ iPrOH フィッシャー

装置：プロッター（バイオラッド社のバイオ／ドット装置）

方法：DNAを捕まえるのに使用される膜を各々の場合に変える以外は、同じ方法により6画分を調製した。約

12

*持をもたらすことができた。この試験により、エタノール中のイソプロパノールおよびプロパノールの%が増加すると共に保持するDNAの量も増加した。

【0037】多量の高分子量のDNA（電気泳動の始点にほぼ近い位置のDNA）はiPrOH（100%）を用いると保持し、これは使用された結合バッファー中で最も高かった。DMSOはDNAを保持しなかった。

【0038】以下に、結合バッファーがDNAを保持する能力に関して、スタンダードと比較して好ましいものから順にゲル電気泳動の分析に基づく結果を集約する。

【0039】

保持しないもの

- 10% PEG
- 20% PEG
- 6M グリセロール
- 6M 尿素
- 30% NH₄OH
- 10% H₂SO₄
- 6M NaOAC
- MeOH 100%
- または水による希釈液
- 100%未満のEtOH
- 100%未満のCH₃CN
- 100%未満のDMSO

※atman Ltd.）、イングランド、英国）コントロール 7823

ワットマンGF/D（コントロール 4706）

ワットマンGF/C（コントロール 1505）

λDNA（BRL）ロット9 mo 1104（503 μg/803 μl）

ニトロセルロース（シュライヒャー アンド シュエル（Schleicher & Schuell）、キーン、NH）44031621

プレップ ア ジーン（バイオラッド）コントロール 4004。

【0044】

744241

1. 3 μlのλDNAを約248 μlのTEバッファーに溶解する。これを約750 μlのiPrOHで希釈し、そしてフィルターを通過させることによりプロッターに添加する。すべての液体が通過した後、約1分間風

(7)

13

乾する。再び約750 μ lのiPrOHを添加し、約1分間風乾する。すべてのiPrOHが通過した後、約750 μ lのプレップアジーン洗浄バッファーを添加し、通過後約1分間風乾する。

【0045】ウエルのところでフィルターを切る。切った部分を遠心チューブに入れる。50 μ lのプレップアジーン溶出バッファーを添加する。約60℃において約20分間加熱する。ゲル電気泳動による結果から、イソプロパノールがワットマンGF/B、ワットマンGF/C、MSIグラス、ゲルマンAEおよびニトロセルロースに適していることが示唆される。イソプロパノールとゲルマンAEフィルターはほぼ100%のDNAを保持した。

【0046】

【実施例5】この実験は、1) DNAの結合に対するpHの効果、2) 結合表面としてのCELITE（珪そう土）の効果、および3) シラン化表面（即ち、疎水性）へのDNA固着に対するiPrOHの効果を測定する。

【0047】物質：

シラン化表面

プレップアジーン

iPrOH

1N NaOH

1N HCl

1 \times TEバッファー中の1% アガロースゲル

TEバッファー

泳動マーカー染色液

λ DNA

方法：248 μ lのTEおよび1.3 μ lの λ DNAを含む7つのサンプルを調製した。サンプル1-3には3つのシラン化表面（ジーンクリーンマトリックス（バイオ101、ラジョラ、CA）、サークルプレップマトリックス（バイオ101）、およびプレップアジーンマトリックス（バイオリッド）の内の1つを添加し、次に750 μ lのiPrOHを添加する。60℃において10分間加熱する。

【0048】この間、他の3つのサンプルには20 μ lのプレップアジーンマトリックスを添加し、4番目には50%セライト545（フィッシャー）および50%TEバッファーの溶液20 μ lを添加する。セライトサンプルおよび他の3つのサンプルのうちの1つには750 μ lのプレップアジーンバッファーを添加し、1サンプルには1N水酸化ナトリウムで調整したpH11.0のプレップアジーンバッファー750 μ lを添加する。1サンプルには1N塩酸で調整したpH0.1のプレップアジーンバッファー750 μ lを添加する。4つすべてを10分間60℃において加熱する。

【0049】7サンプルを遠心分離し、そして結合バッファーをデカントにより除く。各サンプルに対して、最

14

初に使用したのと同じ結合バッファー750 μ lを添加する。60℃において5分間加熱する。遠心分離し、そして結合バッファーをデカントにより除く。各サンプルに対して500 μ lのプレップアジーン洗浄バッファーを添加し、5分間攪拌/振盪し、遠心分離し、デカントし、60℃において10分間乾燥する。25 μ lのプレップアジーン溶出バッファーを添加し、60℃において10分間加熱し、遠心分離し、バッファーを集め、溶出段階を繰り返す。

【0050】溶出された画分をゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダードDNAサンプルと比較した。その結果、シラン化表面からはDNAが回収されず、即ち、前の実験においてDNAは表面に結合せず、沈殿しなかったことが証明された（沈殿物は表面に結合せず、そして洗浄段階で洗浄された）。

【0051】

【実施例6】この実験は、ニトロセルロース膜に対するDNAの結合能力に関して、結合バッファーを比較する。

20 【0052】出発物質：

洗浄バッファー（50%EtOH 50%（40mMトリリス、4mM EDTA、6M NaCl、pH7.4））

結合バッファー（50mM トリス、1mM EDTA、6M NaClO₄、pH7.5）

溶出バッファー（10mM トリス、1mM EDTA、pH8.0）

ニトロセルロース（5.0 μ M AE98 オーダー#19020 ロット643317 S&S）

30 ニトロセルロース（0.45 μ m BA85 ロット#9039/7 S&S）

1 \times TAE（1 \times =89mM トリス-ホウ酸、2mM EDTA、89mMホウ酸）中の1%アガロースゲル

泳動マーカー染色液

TEバッファー

iPrOH

EtOH

KSCN

8M 塩酸グアニジン

40 TBSバッファー

NaClO₄

プレップアジーン キット

方法：7つの同一サンプル（248 μ lのTEバッファーおよび1.3 μ lの λ DNA）を調製した。各工程で結合バッファーを変える以外は実施例4と正確に同じ方法で、プロッターを使用して7サンプルをニトロセルロース膜に結合させる。

【0053】DNA溶液を750 μ lの結合バッファーに添加し、次にウエルに添加する。液体を通過させ、1分間風乾する。ウエルにそれぞれの結合バッファー75

(8)

15

0 μ l を添加し、液体の通過後 1 分間風乾する。750 μ l の洗浄バッファーで洗浄する。液体の通過後 1 分間風乾する。

【0054】各ウエルを以下のように丸く切り、遠心チューブに入れる。溶出バッファー 50 μ l を添加し、60℃において 10 分間加熱する。

【0055】溶出された DNA サンプルをゲル電気泳動により分析し、そしてスタンダード DNA サンプルと比較する。この結果から、イソプロパノール、プロパノール、およびエタノールが DNA を保持したが、カオトロブによる DNA の保持は顕著に少ないことが示唆される。

【0056】

【実施例 7】この実験の目的は、クラミジア (*Chlamydia*) 溶解物に加えた λ DNA が、イソプロパノールを結合バッファーとして用いた場合に珪素土に結合するか否かを測定するものである。

【0057】物質：

イソプロパノール (アルドリッチ、ミルウオーキー、W I 02610MW)

ブレップ ア ジーン キット (バイオラッド 41640)

λ DNA - (BRL 503 μ g/803 μ l)

クラミジア (-) 溶解物

ウエイカントリーヘルス部門 (Wake County Health Dept.) のクラミジア (-) 溶解物

TE バッファー (10mM トリス塩酸、1mM EDTA, pH8)

TAE バッファー (1 \times)

エチジウム ブロマイド (10mg/1ml ストック (シグマ Cat #E-875 ロット #97E-3722))

1 \times TAE バッファー中の 4% ヌシーブ (NuSieve) アガロース

ϕ X174 RF DNA の Hae III 分解物 (BRL Cat #5611SA ロット #940103)

λ DNA の Hind III 分解物 (BRL Cat #5612SA ロット #940104)

タイプ II 電気泳動マーカー染色液 (25% フィコル、0.25% ブロムフェノールブルー、0.25% キシレンシアノール)

電気泳動ユニット：BRL ホライズン 58

サブマリンユニット

パワーユニット：ファルマシア タイプ EPS 500/400

写真装置：ボラロイド タイプ 50 ランドカメラ

ボラロイド タイプ 57 フィルム

フォトダイン ライト ボックス UV

16

その他：シリコン化された滅菌マイクロ遠心チューブ
ゲル/ローディングピペット チップス (ストラタジーン、ラジョラ、CA)

サンプル、調製および方法：それぞれ 250 μ l のクラミジア (-) ヒト サンプルを含む 13 サンプルを調製する。各サンプルに λ DNA の 1:10 希釈液を 10 μ l ずつ添加する。14 番目のサンプルは水 250 μ l および λ DNA の 1:10 希釈液 10 μ l を含み、クラミジア (-) ヒト サンプルを含まないように調製される。

【0058】サンプルのうちの 5 つとスタンダードには、20 μ l のブレップ ア ジーンローディングマトリックスを添加し、次に 750 μ l のイソプロパノールを添加して室温で 10 分間攪拌する。他の 8 サンプルには最初にイソプロパノールを添加し、次に結合マトリックスを添加して攪拌する。後の実験は 13 サンプルすべてとスタンダードについて全く同様に実施した。

【0059】サンプルを室温で 10 分間攪拌後、1 分間遠心分離し、デカントし、そして上清を捨てる。750 μ l のイソプロパノールで洗浄し、室温で 10 分間攪拌し、遠心分離し、デカントし、そして上清を捨てる。50℃で 10 分間加熱して結合マトリックスを乾燥させる。25 μ l のブレップ ア ジーン溶出バッファーを添加する。50℃で 10 分間加熱し、1.5 分間遠心分離する。上清を集めて、各 14 サンプルから得られた溶出画分を混ぜて溶出段階を繰り返すことにより、14 の (50 μ l) 溶出 DNA サンプルが得られる。これらの溶出サンプルをゲル電気泳動により分析することにより、どの DNA が溶出されたかを測定する。

【0060】この実験から、DNA は細胞残渣 (即ち、炭素化合物、蛋白質、核酸、等々) を含むサンプルから取得できることが証明される。コントロールの λ DNA とヒト DNA は共にサンプルから取得される。また、この実験から、多くの異なるプロトコルはイソプロパノールを結合バッファーとして使用することができ、そしてサンプルから高いパーセンテージで DNA を取得することも証明される (例えば、結合段階において加熱を行うか否か、2 つの結合段階が使用できるか 1 つの結合段階が使用できるか、洗浄段階は 50% エタノールおよび 50% の低濃度の EDTA, pH8.0 バッファーを使用できるかまたは洗浄しないかである。試薬の添加順序は重要でなく、言い換えれば、結合バッファーまたは結合マトリックスを最初に添加しても各サンプルから回収される DNA の量に顕著な差はない。)

【0061】本発明は特定の修飾に関して記述されているが、それらの詳細は限定のための構成ではなく、本発明の趣旨および目的から離れる事なく、さまざまな等価物、変化および修飾を加えてもよく、そしてそのような等価物が本明細書に含まれることが理解される。

【公報種別】特許法（平成6年法律第116号による改正前。）第64条の規定による補正

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年（1998）8月13日

【公告番号】特公平7-51065

【公告日】平成7年（1995）6月5日

【年通号数】特許公報7-1277

【出願番号】特願平4-113578

【特許番号】2130984

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09

B01J 20/02 Z

【F I】

C12N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成8年7月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程からなる、溶液からDNAを精製する方法：

（a）前記溶液に、セライト珪そう土、シリカポリマー、珪酸マグネシウム、シリコーン窒素化合物、珪酸アルミニウムおよび二酸化ケイ素から選択される親水性表面を添加し；

（b）80-100%イソプロパノール、80-100%プロパノール、95-100%エタノール、100%アセトニトリル、並びにイソプロパノール、プロパノールおよびエタノールから選択される少なくとも2種類のアルコールそれぞれ20-80%を本質的に含む混合物、からなるグループから選択される、水溶性有機溶媒を添加し；

（c）（a）および（b）工程からの成分を含むDNA溶液を液体画分と非液体画分に分離し；

（d）（c）工程からの非液体画分を洗浄し；

（e）（d）工程からの非液体画分から液体画分を分離し；そして

（f）（e）工程からの非液体画分からDNAを遊離させる。

【請求項2】 工程（f）の後に、さらに、溶出バッファーを添加する工程（g）を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 親水性表面がセライト珪そう土である、請求項1記載の方法。